

Aus der Stoffwechselabteilung (Leitender Arzt: Prof. A. Labhart) der Medizinischen Klinik

(Direktor: Prof. P. H. Rossier) der Universität Zürich

Arbeit unter der Leitung von PD Dr. E. R. Froesch

Stoffwechsel des Fettgewebes normaler, alloxandiabetischer und nach Nahrungskarenz wiedergefütterter Ratten während langfristiger Inkubation in vitro

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der Universität Zürich

vorgelegt von

Urs-Albert Meyer

von Frauenfeld

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. A. Labhart

Zürich 1966

Aus der Stoffwechselabteilung (Leitender Arzt: Prof. A. Labhart) der Medizinischen Klinik

(Direktor: Prof. P. H. Rossier) der Universität Zürich

Arbeit unter der Leitung von PD Dr. E. R. Froesch

Stoffwechsel des Fettgewebes normaler, alloxandiabetischer und nach Nahrungskarenz wiedergefütterter Ratten während langfristiger Inkubation in vitro

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der Universität Zürich

vorgelegt von

Urs-Albert Meyer

von Frauenfeld

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. A. Labhart

Zürich 1966

Meiner Mutter und dem Andenken meines Vaters gewidmet



Stoffwechsel des Fettgewebes normaler, alloxandibetischer und nach Nahrungskarenz wiedergefütterter Ratten während langfristiger Inkubation *in vitro**

URS A. MEYER

Stoffwechselabteilung (Leitender Arzt: Prof. A. LABHART) der Medizinischen Klinik
(Direktor: Prof. P.H. ROSSIER) der Universität Zürich

Eingegangen am 27. Juli 1966

Metabolism of Adipose Tissue in Normal, Alloxan-diabetic and in fasted-refed Rats During Prolonged Incubation in vitro.

Summary. A method for the prolonged incubation of adipose tissue *in vitro* is described. — Adipose tissue of normal, alloxan diabetic and fasted-refed rats survives *in vitro* for 24 hours and remains responsive to insulin. — The glucose uptake of diabetic adipose tissue rises during 8 to 16 hours of incubation *in vitro* to values which are on the same order as those of normal tissue. This effect is independent of insulin. — Basal glycerol release rises during incubation. The glycerol release of the tissue is stimulated by insulin at the beginning of the incubation and inhibited at the end of incubation. — The comparison of the stimulation of intracellular glucose metabolism by prolonged incubation and by insulin may permit one to distinguish insulin effects on glucose transport from other possible effects on glucose metabolism. — The mechanisms responsible for the insulin-independent glucose penetration during prolonged incubation are presently being investigated.

Métabolisme du tissu adipeux de rats normaux, alloxane-diabétiques et réalimentés après carence alimentaire pendant une incubation prolongée in vitro.

Résumé. Une méthode permettant l'incubation *in vitro* de longue durée du tissu adipeux est décrite. — Ainsi le tissu adipeux épидидymaire du rat survit *in vitro* jusqu'à 24 heures. — L'étude a porté sur le tissu adipeux de rats normaux, réalimentés après jeûne et alloxanisés. — Pendant toute la durée de l'incubation, le tissu répond à la stimulation par l'insuline. — Le métabolisme du glucose du tissu adipeux «diabétique», d'abord abaissé, augmente au cours de l'incubation à des valeurs comparables au

tissu adipeux «normal», ceci notamment en l'absence d'insuline. — La production de glycérol par le tissu augmente pendant l'incubation. L'insuline a une action stimulatrice sur la lipolyse au début, mais une action inhibitrice à la fin de l'incubation. — La comparaison entre l'action stimulatrice d'une incubation de longue durée sur le métabolisme intracellulaire du glucose et celle de l'insuline permettra de séparer l'action de l'insuline sur le transport du glucose de possibles actions supplémentaires de cet hormone dans la normalisation du métabolisme du tissu adipeux «diabétique». — Les causes de la stimulation du métabolisme du glucose lors d'une incubation sont examinées actuellement.

Zusammenfassung. Eine Methode der langfristigen Inkubation von epididymalem Fettgewebe von Ratten wird beschrieben. — Fettgewebe normaler, alloxandibetischer und nach Nahrungskarenz wiedergefütterter Ratten überlebt *in vitro* während 18 bis 24 Stunden. Das Gewebe läßt sich während der ganzen Zeit mit Insulin stimulieren. — Die verlängerte Inkubation von Fettgewebe alloxandibetischer Ratten führt in den ersten 8 bis 16 Stunden ohne Insulin zu einem Anstieg der Glucoseaufnahme auf Werte, die denjenigen des normalen Gewebes entsprechen. — Die basale Glycerinabgabe steigt während der Inkubation an. Zu Beginn der Inkubation wird die Glycerinabgabe durch Insulin gefördert, gegen Ende der Inkubation teilweise gehemmt. — Der Vergleich des intracellulären Stoffwechsels markierter Glucose unter Insulinstimulation und nach langfristiger Inkubation dürfte einen Beitrag zur Beantwortung der Frage leisten, ob Insulin zusätzliche transportunabhängige Wirkungen auf den Glucosestoffwechsel des Fettgewebes ausübt. — Die Gründe der insulinunabhängigen Steigerung der Glucoseaufnahme während der langzeitigen Inkubation werden zur Zeit untersucht.

Die während längerem Fasten auftretenden Veränderungen des Fettgewebestoffwechsels werden durch Wiederfütterung aufgehoben [11, 8, 28]. Eine Normalisierung des Stoffwechsels kann auch durch langzeitige Inkubation des isolierten Fettgewebes *in vitro* erreicht werden [19]. Es war das Ziel der im folgenden beschriebenen Untersuchungen, die stoffwechselfördernde Wirkung einer langzeitigen Inkubation auch an diabetischem Fettgewebe zu untersuchen und im besonderen die Frage zu klären, ob die Steigerung der Glucoseaufnahme allein oder noch zusätzliche Insulinwirkungen für die Wiederherstellung der metabolischen Aktivität verantwortlich sind.

* Diese Arbeit erfolgte mit Unterstützung durch die United States Public Health Service (Grant No. A 5'387) und den Schweizerischen Nationalfonds (Nr. 3'854).

Auf Grund der Arbeiten von HERRERA et al.¹ entwickelten wir dazu eine Inkubationsmethode, die die Reaktionsfähigkeit des Gewebes über Stunden gewährleistet. Eine Beschreibung dieser Methode und der damit erhaltenen Resultate mit epididymalem Fettgewebe normaler, alloxandibetischer und nach Nahrungskarenz wiedergefütterter Ratten ist Inhalt der vorliegenden Arbeit.

Material und Methoden

Versuchstiere. Drei Gruppen rein gezüchteter Osborn-Mendel-Ratten wurden verwendet:

¹ Ich bin den Herren Prof. A.E. RENOLD, Dr. M.G. HERRERA und Dr. G.R. PHILIPPS für die Überlassung ihres Manuskripts lange vor der Publikation zu Dank verpflichtet.

a) *Gefütterte Ratten* hatten freien Zugang zur Nahrung und wurden bei einem Gewicht von 120 bis 140 g getötet.

b) *Wiedergefütterten Ratten* wurde bei einem Ausgangsgewicht von 160 bis 180 g während 120 Stunden jegliche Nahrung außer Wasser entzogen und anschließend wurden sie 24 Stunden mit kohlenhydratreicher, fettarmer Diät gefüttert.

c) *Alloxandiabetische Ratten*: Bei diesen Tieren mit einem Ausgangsgewicht von 140 bis 160 g wurde nach einer Fastenzeit von 24 Stunden 45 mg Alloxan pro kg Ratte in die Schwanzvene injiziert. Anschließend hatten die Tiere wieder freien Zugang zur Nahrung und wurden 96 Stunden nach der Injektion dekapitiert.

Bei schlechtem Zustand wurde am dritten und vierten Tage nach Alloxan je 10 ml Ringerlösung mit 0,3 mEq. Kalium s.c. injiziert.

Blutzuckerbestimmungen solchermaßen behandelter Ratten vor der Dekapitation ergaben durchwegs Werte zwischen 600 und 1000 mg%.

Inkubationsmedien. Als Inkubationsmedium wurde in den meisten hier beschriebenen Versuchen steriles Zellkulturmedium nach EAGLE et al. [5] mit der von EARLE [6] beschriebenen Zusammensetzung des Bicarbonatpuffers verwendet (General Biochemicals Laboratory Park, Chagrin Falls, Ohio, USA). Es zeigte sich in späteren Versuchen, daß die sterile Pufferlösung allein, ohne Zugabe essentieller Aminosäuren und Vitamine, für die beschriebenen Inkubationszeiten genügt. Auch der Zusatz von 5% Serum fastender Ratten erwies sich als nicht notwendig für das Überleben des Gewebes. 5 mg Penicillin und 5 mg Streptomycin pro 100 ml wurden allen Inkubationsmedien beigelegt. Weiter enthielten die Lösungen Albumin in Konzentrationen zwischen 1 und 2 g pro 100 ml. Kristallines Schweineinsulin mit einer Aktivität von 23,9 IE/mg wurde in Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer mit 200 mg Albumin pro 100 ml verdünnt. Weitere Zusätze sind in den einzelnen Experimenten angegeben.

Vor der Inkubation wurden die Lösungen mit einem 95% O₂ — 5% CO₂ Gasgemisch gesättigt (pH 7,4) und auf 37° C vorgewärmt.

Inkubationstechnik. Die Ratten wurden durch Dekapitation getötet, das epididymale Fettgewebe möglichst rasch und mit einem Schnitt weggetrennt und je vier Fettzipfel in einem 25 ml Polyäthylenfläschchen (Packard) mit den beschriebenen Lösungen in einem Schüttelapparat (Dubnoff) inkubiert (Schüttelfrequenz 80 pro Minute, Temperatur 37° C). Der Wechsel der Fettzipfel in neue Fläschchen mit frischem Medium erfolgte möglichst schonend alle 4 bis 8 Stunden. Die Inkubationszeiten betrugen zwischen 16 und 24 Stunden. Während der ganzen Dauer der Inkubation wurden die Lösungen unter einer Glocke offen mit 95% O₂ — 5% CO₂ begast, um ein Absinken der Sauerstoffspannung und eine Anhäufung von CO₂ zu verhindern. Mit dieser Technik verdunstet kein Wasser und die Puffer-Lösungen dicken nicht ein. Die Gefäße wurden vor und nach Zugabe des Fettgewebes

gewogen und alle Resultate auf das Feuchtgewicht des Gewebes bezogen.

Bestimmungen. Glucose, Glycerin und Milchsäure wurden enzymatisch bestimmt mit den Reagenzien der Firma Boehringer, Mannheim, Deutschland.

Freie Fettsäuren im Medium wurden nach GORDON [16] extrahiert und titriert.

Zur Glykogenbestimmung wurde das getrocknete, fettfreie Gewebe (Extraktion der Totallipide nach FOLCH et al. [7]) in 30%-iger KOH hydrolysiert, und das Glykogen in 70%-igem Ethanol mit Na₂SO₄ bei 4° C dreimal gefällt. Das Glykogen wurde dann hydrolysiert und Glucose enzymatisch bestimmt.

Bemerkungen zur Methodik. 1. Vorversuche zeigten, daß Inkubationen über die hier angegebenen Zeiten nur mit sterilen Puffern durchgeführt werden können.

2. Die Zerschneidung der Fettzipfel in kleine Stücke und deren gleichmäßige Verteilung auf die Inkubationsgefäße, eine Methode, die sich für kurzfristige Inkubationen in diesem Labor bestens bewährt hat [10], erwies sich für langfristige Versuche als ungünstig. Einmal wird das Gewebe durch das Zerschneiden erheblich verletzt und außerdem ist ein schonender und schneller Wechsel so vieler Einzelstücke von einem Inkubationsgefäß in das andere nicht möglich.

3. Das Gewicht von Fettgewebe nimmt während Inkubationen in Pufferlösungen zu. Dies wird auf eine Aufnahme von Wasser in den extrazellulären Raum zurückgeführt [14, 3]. Insulin hemmt diese Gewichtszunahme zum Teil. So fanden wir in unseren Versuchen eine durchschnittliche Zunahme des Gewichts während 24-stündigen Inkubationen um 100% und mit Insulin (250 µE/ml) eine Zunahme von nur 74,5%.

4. Die Milchsäurekonzentration im Medium stieg während langzeitiger Versuche etwas an, übertraf aber nie 30 mg pro 100 ml. pH-Messungen während einzelner Versuche zeigten nur geringe Schwankungen zwischen 7,3 und 7,5.

Resultate

1. *Glucoseaufnahme des epididymalen Fettgewebes normalgefügter und alloxandiabetischer Ratten während 24-stündiger Inkubation in vitro mit und ohne Insulin.* Tabelle 1 zeigt die Durchschnittswerte der Glucoseaufnahme des epididymalen Fettgewebes normalgefügter Ratten mit und ohne Insulinstimulation bei einer 24 Stunden dauernden Inkubation. Die basale Glucoseaufnahme nimmt von Beginn an zu. Von 16 Stunden an nimmt das Gewebe gegenüber den ersten 4 Stunden signifikant mehr Glucose auf. Von der 4. zur 24. Stunde steigt die Glucoseaufnahme im Durchschnitt um 6,12 µMol/g/Std, d.h. um 112% an. Insulin (250 µE/ml) stimuliert die Glucoseaufnahme während der ersten 4 Stunden auf mehr als das Dreifache des Basalwertes. Die prozentuale Stimulation durch Insulin wird mit der Zunahme der Basalaufnahme im Verlaufe der Inkubation kleiner und beträgt bei 24 Stunden nur noch 180%. Das unter Insulinstimulation stehende Gewebe nimmt am Ende der Inkubation im

Tabelle 1. Glucoseaufnahme des epididymalen Fettgewebes gefütterter Ratten mit und ohne Insulin während 24-stündiger Inkubation *in vitro*

Inkubationsmedium: Eagle's TC-medium, 200 mg Glucose und 1 g Albumin pro 100 ml. Mediumwechsel alle 4 Stunden
Die Resultate sind als μMol Glucose, die pro g Fettgewebe pro Stunde aufgenommen wurden, angegeben. Mittelwerte $\pm$ mittlerer Fehler, n in Klammern

Die Zunahme der Glucoseaufnahme unter 250 μE Insulin/ml ist zusätzlich in Prozenten des Basalwertes angeben

Inkubations- dauer in Std.	I 4	II 8	III 16	IV 24	Statistik				
	Glucoseaufnahme in $\mu\text{Mol/g/Std}$				p I $\leftrightarrow$ II	p I $\leftrightarrow$ III	p I $\leftrightarrow$ IV	p II $\leftrightarrow$ III	p III $\leftrightarrow$ IV
Ohne Insulin	5.47 ± 0.37 (6)	6.55 ± 0.50 (9)	9.01 ± 0.55 (9)	11.59 ± 0.63 (9)	n.s.	<0.0005	<0.0005	<0.005	<0.01
Mit 250 $\mu\text{E/ml}$ Insulin	17.77 ± 1.01 (6)	17.80 ± 1.00 (8)	20.01 ± 0.71 (8)	20.80 ± 1.02 (8)	n.s.	n.s.	<0.05	n.s.	n.s.
% Stimulation	325	272	222	180					

Durchschnitt 3.03 $\mu\text{Mol/g/Std}$ Glucose mehr auf als am Anfang (nicht signifikant).

Fettgewebe alloxandibetischer Tiere wurde unter gleichen Bedingungen inkubiert (Tabelle 2). Diabetisches Gewebe nimmt anfänglich weniger Glucose auf als normales Gewebe. Während der Inkubation steigt die Glucoseaufnahme dann rasch an und erreicht bereits nach 8 Stunden Werte, wie sie beim Gewebe gefütterter Ratten gefunden werden. Prozentual steigt die basale Glucoseaufnahme bei gefütterten Ratten von der 4. zur 8. Stunde im Durchschnitt um 20%, bei alloxandibetischen Tieren aber um 152% an. Nach 8 Stunden nimmt die basale Glucoseaufnahme nur noch wenig zu und bleibt von der 16. Stunde an praktisch gleich. Das Gewebe spricht während der ganzen Inkubationsdauer auf Insulin an. Die prozentuale Stimulation durch Insulin ist am größten, wenn die basale Glucoseaufnahme klein ist, d. h. am Anfang der Inkubation.

2. Abgabe von Glycerin, freien Fettsäuren und Milchsäure durch Fettgewebe alloxandibetischer Ratten mit und ohne Insulin im Verlaufe der Inkubation *in vitro* über 24 Stunden. Die Glycerinabgabe des Fettgewebes alloxandibetischer Ratten (Abb. 1) ist mit 3.55 $\mu\text{Mol/g/Std}$ zu Beginn der Inkubation deutlich höher als die Glycerinabgabe gefütterter Ratten, die unter den gleichen Bedingungen in unseren Laboratorien im Durchschnitt 1.46 $\mu\text{Mol/g/Std}$ beträgt [11]. Insulin steigert die Glycerinproduktion von 3.55 auf 4.23 $\mu\text{Mol/g/Std}$. Dementsprechend werden in der ersten

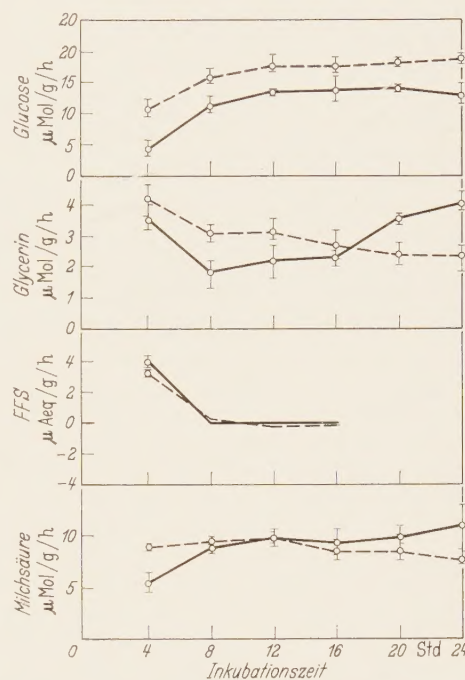


Abb. 1. Abgabe von Glycerin, freien Fettsäuren und Milchsäure durch epididymales Fettgewebe alloxandibetischer Ratten mit (o---o) und ohne (o—o) Insulin während 24-stündiger Inkubation *in vitro*

Versuchsbedingungen gleich wie im Text zu Tabelle 1

Die Resultate sind als Mittelwerte aus drei Inkubationen in μMol pro g Fettgewebe pro Stunde mit der Streubreite angegeben

Tabelle 2. Glucoseaufnahme des epididymalen Fettgewebes alloxandibetischer Ratten mit und ohne Insulin während 24-stündiger Inkubation *in vitro*

Versuchsbedingungen gleich wie im Text zu Tabelle 1

Die Experimente wurden 96 Stunden nach i.v. Injektion von 45 mg Alloxan pro kg vorgenommen (siehe Methode)

Inkubations- dauer in Std.	I 4	II 8	III 16	IV 24	Statistik				
	Glucoseaufnahme in $\mu\text{Mol/g/Std}$				p I $\leftrightarrow$ II	p I $\leftrightarrow$ III	p I $\leftrightarrow$ IV	p II $\leftrightarrow$ III	p III $\leftrightarrow$ IV
Ohne Insulin	3.98 ± 0.33 (14)	10.04 ± 0.83 (6)	12.99 ± 0.80 (6)	11.73 ± 0.65 (6)	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.025	n.s.
Mit 250 μE Insulin pro ml	11.86 ± 0.98 (14)	16.70 ± 0.49 (6)	19.63 ± 1.13 (6)	19.17 ± 0.48 (5)	<0.025	<0.0025	<0.0025	n.s.	n.s.
% Stimulation	298	166	151	163					

Phase der Inkubation, wenn das Gewebe noch wenig Glucose aufnimmt, freie Fettsäuren in das Medium abgegeben. Mit zunehmender Glucoseaufnahme im Verlaufe der Inkubation nimmt die Glycerin- und Fettsäureabgabe vorerst ab. Von der 8. Stunde an sind keine FFS mehr im Medium nachweisbar. Hingegen steigt die Glycerinabgabe im weiteren Verlauf der Inkubation an, wobei jetzt allerdings Insulin die Glycerinabgabe hemmt und nicht wie anfänglich fördert. Diabetisches Gewebe gibt mehr Milchsäure ab als normales Gewebe. Die Milchsäurebildung verläuft nicht parallel zur Glucoseaufnahme, sondern bleibt während der ganzen Dauer der Inkubation mehr oder weniger konstant um $9.0 \mu\text{Mol/g/Std}$. Insulin beeinflusst die Bildung der Milchsäure unter diesen Bedingungen nur unbedeutend.

3. Abgabe von Glycerin und freien Fettsäuren und Glykogengehalt des Fettgewebes wiedergefütterter Ratten im Verlaufe einer 18-stündigen Inkubation mit und ohne Insulin. In Abb. 2 ist ein Versuch dargestellt, bei dem Fettgewebe von Ratten, die nach 5-tägiger Nahrungskarenz wiedergefüttert wurden, während 18 Stunden mit und ohne Insulin und ohne Glucose im Medium inkubiert wurde. Es zeigt sich, daß der hohe Glykogengehalt im Fettgewebe dieser Tiere schnell abnimmt, wenn dem Gewebe kein Substrat mehr zur Verfügung steht. So sinkt der Glykogengehalt in 4 Stunden von

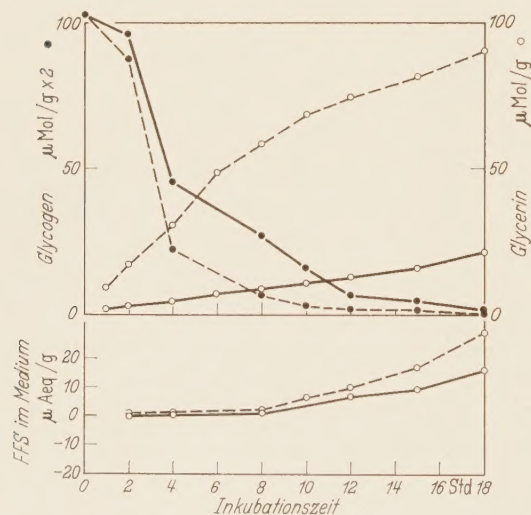


Abb. 2. Stoffwechsel des Fettgewebes von Ratten, die nach 120-stündiger Nahrungskarenz 24 Stunden lang wiedergefüttert wurden, während einer 18-stündigen Inkubation *in vitro* ohne Glucose im Medium mit (o—o) und ohne (o---o) Insulin

Das epididymale Fettgewebe von drei Ratten wurde zur Bestimmung des Glykogengehaltes vor der Inkubation verwendet

In 16 Gefäßen wurden je 4 Fettzipfel inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurde das Gewebe herausgenommen und darin das Glykogen bestimmt. Für die langen Inkubationszeiten wurde das Medium alle 4 Stunden gewechselt. Die Glykogenwerte beruhen auf einer Messung an 4 Fettzipfeln und sind zum besseren Vergleich mit der Glycerinabgabe auf μMol 3-Kohlenstoff-Einheiten umgerechnet

Die Resultate der Glycerin- und Fettsäureabgabe sind Durchschnittswerte von 2–6 Inkubationen

Als Medium wurde ein steriler Bicarbonat-Puffer (Earle's base, siehe Methoden) mit 1.5 g Albumin pro 100 ml verwendet, Insulinkonzentration $1000 \mu\text{E/ml}$

51.7 auf $22.7 \mu\text{Mol/g}$. Der Glykogenschwund wird mit abnehmendem Glykogengehalt des Gewebes langsamer. Nach 18 Stunden ist praktisch kein Glykogen mehr nachweisbar. Insulin verzögert diesen Abbau des Glykogens, verhindert ihn aber nicht. Die Glycerinabgabe steigt fast linear an und beträgt $9.3 \mu\text{Mol/g}$ nach der 1. Stunde und $90.3 \mu\text{Mol/g}$ nach 18-stündiger Inkubation. Insulin hemmt die Glycerinproduktion stark ($1.7 \mu\text{Mol/g}$ nach der 1. Stunde, $21.4 \mu\text{Mol/g}$ nach der 18. Stunde).

Von der 8. Stunde an, wenn der Glykogengehalt schon stark abgesunken ist ($1.3 \mu\text{Mol/g}$ ohne Insulin, $8.0 \mu\text{Mol/g}$ mit Insulin), beginnt das Gewebe vermehrt freie Fettsäuren abzugeben. Diese Abgabe der FFS steigt stetig an und erreicht nach 18 Stunden Werte um $3.4 \mu\text{Aeq/g/Std}$ ohne Insulin und $1.8 \mu\text{Aeq/g/Std}$ mit Insulin. Die Abgabe von FFS an das Medium scheint in umgekehrt proportionalem Verhältnis zur Glykogenabnahme zu stehen.

Diskussion

Die Hauptwirkung des Insulins auf das Fettgewebe scheint die Förderung des Glucosetransportes durch die Zellmembran zu sein (siehe Übersicht von RENOLD et al. [24]). Zusätzliche Wirkungen von Insulin an der Zellmembran der Fettgewebszelle in Abwesenheit von Glucose sind experimentell belegt [11, 1, 18, 2, 15]. Auch Insulinwirkungen am Fettgewebe, die nicht an der Zellmembran zu lokalisieren sind, wurden beschrieben [13, 17, 22]. Es stellen sich somit nach wie vor die Fragen, ob die verschiedenen Wirkungen des Hormons auf einem gemeinsamen Wirkungsmechanismus beruhen, und ob alle durch das Fehlen von Insulin hervorgerufenen Stoffwechselstörungen durch verminderten Glucosetransport erklärt werden können.

HERRERA et al. [19] zeigten, daß der verminderte Stoffwechsel des epididymalen Fettgewebes fastender Ratten durch langzeitige Inkubation *in vitro* mit Pyruvat oder Glucose als Substrat und unter Zusatz von Insulin oder Serum zum Medium normalisiert wird. Kürzlich haben GALTON und FAIN [12] berichtet, daß an freien isolierten Fettzellen fastender Ratten eine Steigerung des Glucosestoffwechsels bei 8-stündiger Inkubation auch in Abwesenheit von Serum, Insulin und Pyruvat festzustellen ist. Noch aufschlußreicher schien uns die Untersuchung dieses Effektes am Gewebe alloxandiabetischer Ratten, bei denen während 48 Stunden oder länger eine totale Insulinkarenz vorlag.

Das epididymale Fettgewebe normaler Ratten konnte in steriler Pufferlösung über 24 Stunden inkubiert werden und hielt einen aktiven Stoffwechsel aufrecht. Kontinuierliche Glucoseaufnahme und die Stimulation dieser Aufnahme mit Insulin während 24-stündiger Inkubation *in vitro* sind in Tab. 1 und 2 am Fettgewebe normaler und alloxandiabetischer Ratten belegt. Das Überleben des Fettgewebes alloxandiabetischer Ratten wird zudem durch die fort-dauernde Abgabe von Glycerin und freien Fettsäuren

an das Medium und deren teilweise Hemmung mit Insulin in Abb. 1 dokumentiert. Das Fettgewebe von nach Nahrungskarenz wiedergefütterten Ratten hält auch ohne Glucose im Medium während Stunden einen aktiven Stoffwechsel aufrecht (Abb. 2). Während der ganzen Dauer der Inkubation wird Glycerin vom Gewebe abgegeben. Insulin hemmt diesen Prozeß.

Der verminderte Stoffwechsel des Fettgewebes alloxandiabetischer Ratten steigt während der langzeitigen Inkubation ohne Insulin im Medium signifikant an (Tabelle 2). Unter den beschriebenen Bedingungen erreicht die basale Glucoseaufnahme innerhalb von 8 bis 16 Stunden Werte, die der Glucoseaufnahme des Fettgewebes gefütterter Tiere entsprechen.

Die Normalisierung der Glucoseaufnahme von Geweben mit vermindertem Stoffwechsel ohne Insulin eröffnet in verschiedener Hinsicht neue Möglichkeiten. Vielleicht kann damit die Frage angegangen werden, ob die Veränderungen, die durch das Fehlen von Insulin im Fettgewebe entstehen [21, 22], ausschließlich auf den sekundären zellulären Kohlehydratmangel zurückzuführen sind, oder ob zusätzliche, physiologisch bedeutsame Wirkungen von Insulin an der Zellmembran oder intrazellulär mitbeteiligt sind.

Die Gründe der vermehrten Aufnahme von Glucose bei Inkubationen *in vitro* sind zu diskutieren.

Die Aktivierung oder Synthese von Enzymen scheint als Ursache der Stoffwechselsteigerung unwahrscheinlich. Es sind zwar verminderte Enzymaktivitäten im Fettgewebe fastender oder diabetischer Tiere, die sich durch Wiederfütterung oder Insulingabe *in vivo* wieder normalisieren lassen, beschrieben worden [13, 17, 27]. Die Tatsache, daß essentielle Aminosäuren für die Stoffwechselsteigerung nicht notwendig sind (siehe Methodik) und daß Puromycin diese nicht beeinflusst [23], schließt proteinsynthesefördernde Mechanismen weitgehend aus.

HERRERA et al. [19] haben der Anhäufung von Zwischen- und Endprodukten des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels in der Inkubationsflüssigkeit Bedeutung beigemessen. Als Beispiel sind die lipogenese-steigernden Wirkungen der Zitronensäure *in vitro* genannt [21, 29]. Da die Milchsäureabgabe während der ganzen Dauer der Inkubation konstant blieb, ist eine vermehrte anaerobe Glycolyse als Ursache der vermehrten Glucoseaufnahme ausgeschlossen. Größere Bedeutung legen wir spontanen Änderungen der Permeabilität der Zellmembran zu, die den vermehrten Durchtritt von Glucose auch ohne Insulin erklären könnte. Das starke Anschwellen des Gewebes in Pufferlösungen (siehe Methodik) bringt zudem veränderte Größenverhältnisse zwischen intra- und extrazellulärem Raum mit sich. Immerhin scheint es sich nicht nur um eine Traumatisierung der Zellmembran zu handeln, da das Gewebe auch nach 24-stündiger Inkubation noch gut auf physiologische Konzentrationen von Insulin anspricht. Das Trägertransportsystem der Membran für Glucose [3, 4] bleibt funktionstüchtig.

Die Glycerinabgabe des Fettgewebes fastender und diabetischer Ratten wird während langfristiger Inkubationen gesteigert (Abb. 1). Analog dazu ist die Glycerinabgabe bei wiedergefütterten Ratten besonders ausgeprägt [11, 20], was daran denken läßt, daß die langfristige Inkubation über einen ähnlichen Mechanismus wie die Wiederfütterung *in vivo* wirksam sein könnte. Die Stoffwechselveränderungen im Gewebe fastender und diabetischer Ratten sind sehr ähnlich [17, 9, 25]. Im ersteren Falle wird wegen des tiefen Blutzuckers das an und für sich zur Verfügung stehende Insulin nicht ausgeschüttet, im zweiten Falle fehlt Insulin vollständig bei hohen Blutzuckerwerten. Das Gemeinsame ist wohl, daß in beiden Fällen keine oder nur sehr wenig Glucose in die Zelle eindringt. Die Hemmung der Lipolyse durch Insulin ist bei wiedergefütterten Ratten vollständig unabhängig vom Glucosetransport [11]. Das Gewebe dieser Tiere enthält viel Glykogen, das für die Wiederveresterung der bei der Lipolyse freiwerdenden Fettsäuren zur Verfügung steht, so daß die Zelle für diesen Zweck nicht auf Glucose von außen angewiesen ist [11, 8, 28]. Wie diese antilipolytische Wirkung von Insulin zustandekommt, ist nicht bekannt. ZIERLER und RABINOWITZ [31] diskutieren im Zusammenhang mit Veränderungen des elektrischen Ruhepotentials die Möglichkeit einer Hemmung des Fettsäuretransports durch die Membran, während FROESCH et al. [11] Anhaltspunkte dafür haben, daß Insulin am lipolytischen Enzymsystem an der Zelloberfläche angreift. Vor allem aber stützt der kürzliche Bericht von Rodbell und Jones über die insulinähnliche, antilipolytische Wirkung von Phospholipase C [26] die Hypothese, daß antilipolytische und glucosetransportfördernde Wirkungen Ausdruck einer allgemeinen Wirkung auf die Plasmamembran der Fettgewebezelle sind. Neuere Untersuchungen in unserem Labor weisen darauf hin, daß sich die beschriebenen Auswirkungen einer verlängerten Inkubation *in vitro* ebenfalls auf die Veränderungen an der Zellmembran zurückführen lassen.

Herrn P.D. Dr. E.R. FROESCH danke ich für die Leitung und Kritik dieser Arbeit. Fr. V. STURZENEGGER, S. DIEM und M. WALDVOGEL für ihre wertvolle Hilfe bei den Arbeiten im Labor.

Literatur

- [1] BEIGELMAN, P.M., and P.B. HOLLANDER: Effect of insulin upon resting electrical potential of adipose tissue. *Proc. Soc. exp. Biol.* **110**, 590 (1962).
- [2] CARRUTHERS, B.M., and A.I. WINEGRAD: Effects of insulin on amino acid and ribonucleic acid metabolism in rat adipose tissue. *Amer. J. Physiol.* **202**, 605 (1962).
- [3] CROFFORD, O.B., and A.E. RENOLD: Glucose uptake by incubated rat epididymal adipose tissue: rate limiting steps and site of insulin action. *J. biol. Chem.* **240**, 14 (1965).
- [4] — — Glucose uptake by incubated rat epididymal adipose tissue: Characteristics of the glucose transport system and action of insulin. *J. biol. Chem.* **240**, 3237 (1965).

- [5] EAGLE, H., V.I. OYAMA, M. LEVY and A.E. FREEMAN: Myo-Inositol as an essential growth factor for normal and malignant human cells in tissue culture. *J. biol. Chem.* **226**, 191 (1957).
- [6] EARLE, W.R.: Production of malignancy *in vitro*; mouse fibroblast cultures and changes seen in living cells. *J. nat. Cancer Inst.* **4**, 165 (1943).
- [7] FOLCH, J., M. LEES and G.H. SLOANE STANLEY: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. biol. Chem.* **226**, 497 (1957).
- [8] FRERICH, H., and E.G. BALL: Studies on the metabolism of adipose tissue. XI. Activation of phosphorylase by agents which stimulate lipolysis. *Biochemistry* **1**, 501 (1962).
- [9] FROESCH, E.R.: Fructose metabolism in adipose tissue from normal and diabetic rats. In: RENOLD, A.E., and G.F. CAHILL, JR., Eds., *Handbook of Physiology*, Section 5, Adipose Tissue, p. 281. Washington, D.C.; American Physiological Society, 1965.
- [10] — H. BÜRGI, E.B. RAMSEIER, P. BALLY and A. LABHART: Antibody-suppressible and nonsuppressible insulinlike activities in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity. *J. clin. Invest.* **42**, 1816 (1963).
- [11] — — P. BALLY and A. LABHART: Insulin inhibition of spontaneous adipose tissue lipolysis and effects upon fructose and glucose metabolism. *Mol. Pharmacol.* **1**, 280 (1965).
- [12] GALTON, D.J., and FAIN, J.N.: Effects of prolonged incubation of isolated fat cells on their response to hormones stimulating lipolysis and glucose metabolism. *Biochem. J.* **98**, 557 (1966).
- [13] GELLHORN, A., and W. BENJAMIN: The intracellular localization of an enzymatic defect of lipid metabolism in diabetic rats. *Biochim. biophys. Acta* **84**, 167 (1964).
- [14] GOODMAN, H.M.: Effects of insulin on water uptake by adipose tissue during incubation *in vitro*. *Endocrinology* **76**, 531 (1965).
- [15] —: Stimulatory action of insulin on leucine uptake and metabolism in adipose tissue. *Amer. J. Physiol.* **206**, 129 (1964).
- [16] GORDON, R.S., JR.: Unesterified fatty acids in human blood plasma. II. The transport function of unesterified fatty acids. *J. clin. Invest.* **36**, 810 (1957).
- [17] GROMOVA, K.G.: Activity of hexokinase and glucokinase of adipose tissue in epididymis of rats and its regulation by insulin. *Vop. Med. Him.* **10**, 631 (1964).
- [18] HERRERA, M.G., and A.E. RENOLD: Hormonal effects on glycine metabolism in rat epididymal adipose tissue. *Biochim. biophys. Acta* **44**, 165 (1960).
- [19] — G.R. PHILIPPS and A.E. RENOLD: Stimulation of metabolic activity of adipose tissue from fasted rats by prolonged incubation *in vitro*. *Biochim. biophys. Acta* **106**, 221 (1965).
- [20] JUNGAS, R.L., and E.G. BALL: Studies on the metabolism of adipose tissue: XVIII. *In vitro* effects of insulin upon the metabolism of the carbohydrate and triglyceride stores of adipose tissue from fasted-refed rats. *Biochemistry* **3**, 1696 (1964).
- [21] MARTIN, D.B., and P.R. VAGELOS: The mechanism of tricarboxylic acid regulation of fatty acid synthesis. *J. biol. Chem.* **237**, 1787 (1962).
- [22] LEONARDS, J.R., and B.R. LANDAU: A study of the equivalence of metabolic patterns in rat adipose tissue: Insulin versus glucose concentration. *Arch. Biochem.* **91**, 194 (1960).
- [23] PHILIPPS, G.R., and A.E. RENOLD, zitiert in HERRERA, M.G., et al. *Biochim. biophys. Acta* **106**, 221 (1965).
- [24] RENOLD, A.E., O.B. CROFFORD, H. BÜRGI and E.R. FROESCH: Insulin and the metabolism of adipose tissue, 5th Congr. Intern. Diabetes Federation, Toronto, 1965. In: "On the Nature and Treatment of Diabetes (WRENSHALL, G.A., and B.S. LEIBEL, Eds.) *Excerpta Medica International Congress Series* No. 84, p. 146.
- [25] ROBINSON, D.S.: The clearing factor lipase activity of adipose tissue. In: RENOLD, A.E., and G.F. CAHILL, JR., Eds., *Handbook of Physiology*, Section 5, adipose tissue, p. 295. Washington, D.C.; American Physiological Society, 1965.
- [26] RODBELL, M., and A.B. JONES: Metabolism of isolated fat cells: III. The similar inhibitory action of Phospholipase C and of insulin on lipolysis stimulated by lipolytic hormones and theophylline. *J. biol. Chem.* **241**, 140 (1966).
- [27] SALAMAN, M.R., Ph.D. thesis, Oxford, England, 1963.
- [28] SHAFRIR, E., and S. KERPEL: Fatty acid esterification and release as related to the carbohydrate metabolism of adipose tissue: effect of epinephrine, corticoid and adrenalectomy. *Arch. Biochem. Biophys.* **105**, 237 (1964).
- [29] VAGELOS, P.R., A.W. ALBERTS and D.B. MARTIN: Studies on the mechanism of activation of acetyl coenzyme-A carboxylase by citrate. *J. biol. Chem.* **238**, 533 (1963).
- [30] WINEGRAD, A.I.: Adipose tissue in diabetes, in: RENOLD, A.E., and G.F. CAHILL, JR., Eds., *Handbook of Physiology*, Section 5, adipose tissue, p. 319. Washington, D.C.; American Physiological Society, 1965.
- [31] ZIERLER, K.L., and D. RABINOWITZ: Effect of very small concentrations of insulin on forearm metabolism. Persistence on its action on potassium and free fatty acids without its effects on glucose. *J. clin. Invest.* **43**, 950 (1964).

URS A. MEYER
Stoffwechselabt. d. Med. Klinik
der Universität
Zürich/Schweiz

CURRICULUM VITAE

Am 7. Juli 1938 wurde ich in Baden im Aargau geboren, verlebte meine Jugend in Würenlos, besuchte in Baden die Bezirksschule und anschliessend die Kantonsschule in Aarau. Matur 1958. Darauf folgte das Medizinstudium an den Universitäten Genf und Zürich. Das eidgenössische Arztdiplom wurde mir im Mai 1964 erteilt. Seit Frühjahr 1965 bin ich wissenschaftlicher Assistent im Stoffwechsellabor der Medizinischen Klinik der Universität Zürich.

